Lane Medical Library

Über das Vorkommen von Sporen im Säuglingsdarm.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen medizinischen Fakultät

der

K. b. Friedrich-Alexander-Universität zu Erlangen

vorgelegt von

Eduard Emil Müller

aus Annweiler (Rhein-Pfalz)

ERLANGEN.

K. b. Hof- und Univ.-Buchdruckerei von Fr. Junge (Junge & Sohn).

1898.

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät zu Erlangen.

Referent: Professor Dr. Hauser.

Seinem Schwager

Herrn Bierbrauereibesitzer Val. Metz

in Weinheim a. d. Bergtr.

und seiner lieben Schwester

Emilie Metz, geb. Müller

aus Dankbarkeit gewidmet

vom Verfasser.

Verzeichnis der benützten Litteratur.

1. Finkelnburg: Vierteljahrschrift für gerichtliche Medizin. Bd. XXX.
2. Hempel: Deutsche medizinische Wochenschrift. Jahrg. 94, Nr. 44, S. 841.
3. Baginsky: Cit. nach Heubner: Berliner klin. Wochenschrift 1895. S. 596.
4. Penzoldt: Bericht des ärztlichen Bezirksvereins. Erlangen 1888.
5. Sior: Jahrbuch für Kinderheilkunde. Bd. XXXIV.
6. Petri und Maassen: Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsamt. Bd. VII.
7. Picted und Weil: Berliner klinische Wochenschrift 1891. Nr. 41.
8. Hesse: Zeitschrift für Hygiene. 1890.
9. Hueppe: Berliner klinische Wochenschrift. 1881.
10. Kramszlyk: Jahrbuch für Kinderheilkunde. Bd. XXXVII, S. 249.
11. Flügge: Zeitschrift für Hygiene. Bd. XVII.
12. Lübbert: Archiv für Hygiene. Bd. XXII.
13. Sterling: Centralblatt für Bakteriologie. 1895. Bd. I, S. 473.

14a. Bienstock: Zeitschrift für klinische Medizin. Bd. VIII, 1884.

14b. Schild: Zeitschrift für Hygiene. Bd. XIX, Heft 1.

15. Lembke: Archiv für Hygiene. Bd. XXVI, S. 301.
16. Mac Fadyn, Allan and Blaxall: Journal of Pathology and Baeker. 1894, Vol. III.
17. Rabinowitsch: Zeitschrift für Hygiene. Bd. XX.
18. Biedert: Berliner klinische Wochenschrift. 1894. Kuhmilch, Milchsterilisation und Kinderernährung.
19. Globig: Zeitschrift für Hygiene. Bd. III, 1888.
20. Heim: Lehrbuch der bakteriol. Untersuchung und Diagnostik. S. 77.
21. Heim: Übersichtliche Einteilung und Tabellen etc. Vortrag vom 12. Juli 1897 (s. Lehrbuch).
22. Gilbert und Dominici: Cit. nach Hygienische Rundschau. Bd. 7, S. 640.
23. Eberle: Centralblatt für Bakteriologie. Bd. 19, Nr. 1.
24a. Lübbert: Archiv für Hygiene. Bd. XXII. Über die Natur u. s. w.
24b. Braun: Beitrag zur Milchfrage mit besonderer Berücksichtigung der Erlanger Marktmilch. Inaug.-Diss. Erlangen 1898.
25. Flügge: Microorganismen II. S. 208.
26. ibidem. S. 233.

Wenn auch die Natur der pathologisch-anatomischen Prozesse bei den Sommerdiarrhöen der Säuglinge grossenteils erschlossen ist, so steht doch die Frage nach dem ätiologischen Moment trotz der hohen praktischen Wichtigkeit noch immer im Mittelpunkt der Diskussion. Die Statistik war berufen, durch den gesicherten Nachweis der Abhängigkeit der Säuglingsmortalität von der künstlichen Ernährung einerseits und der Höhe der Temperatur andererseits, die experimentelle Forschung mächtig zu unterstützen und in die richtigen Bahnen zu leiten. Die Thatsache, dass künstliche Ernährung die bei seinen anatomischen und physiologischen Eigentümlichkeiten ohnehin beträchtliche Disposition des Säuglings zu Erkrankungen des Verdauungstraktus noch bedeutend steigert, berechtigte zwar vollauf zu der Ansicht, dass die Ernährungsschwierigkeit durch die Verschiedenheit der beiden Nährsubstrate, der Muttermilch und Kuhmilch, bedingt sei; aber der Beweis der Abhängigkeit von der Temperatur, der Beweis, dass jeder Temperaturerhöhung eine akute Steigerung der Erkrankungen folgt[1]), musste die einseitige Betonung der chemisch-physiologischen Differenzen zu Gunsten einer im wesentlichen bakteriologischen Aera verdrängen; denn die Ansicht Meynert's und anderer Autoren, dass die Höhe der Temperatur an sich für die Steigerung

der Mortalität verantwortlich zu machen sei, konnte wiederum, abgesehen davon, dass ihr in den meisten Fällen das klinische Bild nicht entsprach und zudem Endemien auch im Winter zur Beobachtung kommen, die auffällige Neigung des künstlich ernährten Kindes, an der Cholera infantum zu erkranken, nicht begründen; es lag also nach Analogie mit gewissen Infektionskrankheiten des Erwachsenen, die man mit Sicherheit auf eine mikroparasitäre Ursache zurückführen konnte, der Verdacht ganz besonders nahe, dass die durch das Zusammentreffen beider Momente geschaffene Noxe bakterieller Natur sei. Man wies zwar schon längst auf Zersetzungen der Milch hin, suchte ihre Gefährlichkeit durch den Kochprozess herabzusetzen, brachte sie zu den Sommerdiarrhöen in ätiologische Beziehung, aber erst mit dem Aufschwung der bakteriolischen Forschung tritt an Stelle empirischer Beobachtung eine durch das Experiment geläuterte Anschauung. Wiewohl vorerst alle Versuche, konstante und typische Unterschiede zwischen der Flora des normalen und pathologischen Kotes festzulegen, vergeblich waren, so rückte doch der Befund mehrerer pathogener Bakterien bei den Sommerdiarrhöen die Vermutung einer bakteriellen Infektion an die Grenze der Wahrscheinlichkeit; der strikte, wenn auch indirekte Beweis schien geliefert durch die Erfolge der Milchsterilisation. Da die Gewinnung steriler Milch sich technisch und praktisch als undurchführbar erwies, war man, dem Ergebnis bakteriologischer Untersuchungen Rechnung tragend, darauf angewiesen, die supponierten, unvermeidlichen Keime zu vernichten und die Milch durch geeignete Massregeln keimfrei zu erhalten. Beiden Bedingungen schien das Verfahren Soxhlets zu genügen, welches

die Abtötung der Keime durch $^3/_4$stündiges Erhitzen bewirken und die Gefahr einer Reinfektion durch die Benützung der Koch- als Saugflasche vermeiden sollte; die Ärztewelt begrüsste anfänglich dieses anscheinend so rationelle Prinzip mit hoher Begeisterung, die unter anderen Professor Walther Hempel[2]) zu der bezeichnenden Bemerkung hinriss: „Es sei gewiss nicht zu bestreiten, dass seit der Einführung der Milchsterilisation die Diarrhöen der Säuglinge verschwunden sind.“ Abgesehen davon aber, dass die Benutzung dieser Apparate gerade in den Kreisen der ärmeren Bevölkerung, wo die Cholera infantum die meisten Opfer fordert, an dem Kostenpunkt scheitert, abgesehen davon, dass durch den intensiven Kochprozess die chemisch-physikalischen Unterschiede der Mutter- und Kuhmilch, denen doch wohl ein disponierendes Moment zuzusprechen ist, noch verschärft werden, konnten immerhin die scheinbaren Erfolge nicht nur der sogenannten „Sterilisation“, sondern auch der mit wachsender Erkenntnis sich verbessernden Hygiene der Milchgewinnung zugeschrieben werden. Bald nun schwächten den Taumel der Begeisterung klinische Erfahrungen und bakteriologische Studien ab. Das Kaiser- und Kaiserin-Friedrich-Krankenhaus in Berlin blieb nach Baginsky[3]) trotz aller Umsicht, trotz Reinigung der Flaschen mit Bürste und Sodalösung, trotz Sandspülmaschinen, trotz mehrstündiger Sterilisation nicht von Endemien verschont, welche dortselbst ihren Ursprung nehmen; weiterhin beobachtete Penzoldt[4]) neben anderen Klinikern in poliklinischer Praxis Verdauungsstörungen infolge Genusses verdorbener „steriler“ Milch. Die Erfahrung der Ärzte bestätigte nun auch die experimentelle Untersuchung. Die Arbeiten von Sior[5]), Petri und Maassen[6]), Picted und Weil[7]), Hesse[8]),

Hueppe[9]), Kramsztyk[10]) zeigten, dass „sterile“ Milch nach dem jetzt gebräuchlichen Verfahren keine keimfreie, sondern keimarme sei und wiesen auf die sporentragenden Dauerformen, die gefährlichsten Feinde jeder Sterilisation, hin. Besonderes Aufsehen erregte jedoch bei der Autorität des Verfassers und der Exaktheit der Forschung die Arbeit von Flügge[11]), welcher bei der kritischen Prüfung des Soxhlet-Verfahrens sich nicht mit dem Nachweis der Dauerformen begnügte, sondern durch das Studium ihrer Biologie die übertriebene Wertschätzung dieser Apparate auf das berechtigte Mass zurückführte. Nachdem nun die klinische Erfahrung zeigte, dass trotz Sterilisation Misserfolge zu verzeichnen sind und von 12 Aerobien, welche von Flügge aus Milch gezüchtet wurden, sich 3 als pathogen erwiesen und bei Versuchstieren schwere spezifische Erscheinungen hervorriefen, so ist die Vermutung wohl begründet, dass wenigstens für einen Teil der Diarrhöen diese Formen ätiologisch verantwortlich zu machen sind. Schon die Gesamtheit der biologischen Eigenschaften lassen die Gruppe der sporentragenden, besonders der peptonisierenden Bakterien hinreichend verdächtig erscheinen. Ihre Resistenz trotzt der gebräuchlichen „Sterilisation“; ihr Wachstum wird beschleunigt durch höhere Temperaturen, sodass ihre Einsaat und Wucherung in den Sommermonaten ungemein begünstigt wird; die Bildung einer grösseren Menge Pepton, welches den Darmkanal des Säuglings schädigt, erscheint schon an sich bedenklich; der Nachweis einer Toxinbildung durch mehrere Arten würde das klinische Bild einer schweren Intoxication, welches einen grossen Teil der Krankheitsfälle beherrscht, verständlich machen, und wir müssen somit Flügge wohl beistimmen, „dass durch die

Annahme einer ätiologischen Beziehung dieser Bakterien zu den Sommerdiarrhöen sich am besten die örtliche und zeitliche Verbreitung, die Unterschiede der Mortalität von Stadt und Land, der Einfluss jeder Temperatursteigerung am besten erklären liessen". Die Meinung Flügge's, welcher die Diarrhöen auf eine Resorption der nachgewiesenen Toxine zurückführt, wird nicht ohne weiteres durch die Arbeit von Lübbert[12]) modifiziert, welche „das wirksame Prinzip der zersetzten Milch nicht in einem Stoffwechselprodukt, sondern in der Leibessubstanz der Bakterien" sucht. Denn da der Nachweis, auf Grund welcher chemischen Prozesse der Bazillenleib seine toxische Wirkung entfalten könnte, nicht gelang und seine Versuche, ihn durch die Verdauungssäfte in Lösung zu bringen, negativ waren, erscheint ein Zweifel an der vollen Beweiskraft dieser Experimente vorerst wohl noch berechtigt, wenn anders wir nicht eine Resorption der Zelle durch die Darmwand und Lösung des Giftstoffs durch die Körpersäfte supponieren wollen. Nachdem sich nun Kliniker der Ansicht Flügges angeschlossen und Sterling[13]) diese Versuche nachgeprüft und bestätigt hat, sollte der Gegenstand vorliegender Arbeit eine Untersuchung mehrerer Fälle von Sommerdiarrhöen hinsichtlich dieser Dauerformen bilden, um ihre ätiologische Beteiligung zu prüfen; aber schon bei Beginn der Vorstudien erwies es sich als absolut notwendig, durch Erforschung der normalen bakteriologischen Verhältnisse vorerst die Grundlage für die Weiterforschung auf pathologischem Gebiete zu schaffen. Obwohl nämlich die morphologischen und biologischen Eigenschaften der Dauerformen, soweit sie in der Milch zu finden sind, eine eingehendere Darstellung zahlreicher Autoren gefunden haben und es

kaum zu erwarten stand, dass die einzelnen Arten in den Faeces wesentlich von den in der Milch gefundenen Formen differieren könnten, so musste ich doch das Studium ihres quantitativen und qualitativen Vorkommens in den Kuhmilchstühlen als Vorbedingung für die Untersuchung pathologischer Fälle betrachten, da sich die mir zugängliche Litteratur entweder auf blosse aphoristische Angaben oder unvollkommenere Beschreibungen beschränkt. Genaueres findet sich höchstens bei Bienstock[14a]), welcher mit Hilfe der Agarplatte 3 sporentragende Bakterien isolierte, die aber Nachuntersucher nicht wieder auffinden konnten. Schild[14b]) ferner, welcher die Wege der bakteriellen Infektion des Darmkanals bei dem Neugeborenen studierte, beschrieb unter 7 gefundenen Arten 3 peptonisierende, von denen aber nur bei einem von ihm als Subtilis analysierten Angaben über Sporulation zu finden sind. Lembke[15]), welcher bei Hunden den Einfluss der Nahrung auf die Flora des Darms beobachtete, zählt zwei sporenbildende Arten (Nr. 11 und 12 seiner Aufstellung) auf, verzichtete aber leider auf die Anwendung der Agarplatte, die, wie spätere Angaben lehren, zur sicheren Trennung, Wiedererkennung und Charakteristik der Dauerformen unentbehrlich ist.

Bei den eigenen Untersuchungen nun, die äussere Verhältnisse im wesentlichen auf die in dieser Hinsicht ungünstigere kältere Jahreszeit verlegten, konnte ein einheitliches Verfahren zur Isolierung der Sporen keine Anwendung finden, sondern es musste variieren nach den Ansprüchen der Dauerformen an Sauerstoff und Temperatur und somit den besten Wachstumsbedingungen der zu untersuchenden Gruppen der Thermophilen, Aërobier und Anaërobier entsprechen. Die ersteren

glaubte ich, ohne ihnen eine praktische Rolle aus naheliegenden Gründen beimessen zu wollen, schon der Vollständigkeit halber in den Bereich der Untersuchung ziehen zu müssen; nachdem ausserdem Mac Fadyn, Allan und Blaxoll[16]) die Thermophilen auch in den Faeces des Menschen nachgewiesen haben und Lydie Rabinowitsch[17]) den experimentellen Beweis führte, dass das Vorkommen dieser Bakterien im Magen weit hinter der Zahl im Dünn- und Dickdarm zurücksteht und somit zeigte, dass dieselben unter gewöhnlichen Temperaturverhältnissen und anaëroben Bedingungen im tierischen Organismus sich entwickeln könnten, so erscheint auch deshalb ihr Studium nicht ohne weiteres zwecklos.

Der Beschreibung der Untersuchungstechnik nun und der Herstellung zur Züchtung geeigneter Nährböden müssen einige Angaben über das zur Aussaat gelangte Material vorangehen; dasselbe stammte von durchaus gesunden, künstlich ernährten, verschiedenaltrigen Säuglingen aus der hiesigen Krippenanstalt; die Stühle waren fast ohne Ausnahme von gelblicher Farbe, weicher Salbenkonsistenz, von leicht saurer Reaktion und nicht besonders übelriechend; nicht selten war sogar ein leicht aromatischer Geruch bemerkbar, während die Kuhmilchstühle nach Angaben Biederts[18]) alkalische Reaktion und stets einen Geruch nach faulem Käse hätten zeigen müssen.

Von der Anwendung des Agarplattenverfahrens zur Isolierung der einzelnen thermophilen Arten konnte mich die Angabe Globigs[19]), dass im Gegensatz zu den mannigfachen Formen, welche auf Bouillon und Kartoffeln wüchsen, auf Agar nur wenige Arten zur Entwickelung gelangten, nicht abhalten, weil mit dem Verzicht darauf eine sichere Trennung äusserst erschwert

wäre. Die Mängel des gebräuchlichen Agar, welcher bei einer konstanten Temperatur von 62°, die ich zur Zählung verwandte, sich rasch verflüssigt, suchte ich nach dem Vorgang von Rabinowitsch durch eine Steigerung der Konzentration auf 3° zu beseitigen; da aber die Filtration einer solchen Lösung, auch durch Watte, wie jene Autorin es that, eine ungemein zeitraubende ist, suchte ich mit Erfolg eine störende Trübung des Nährmaterials nach Angabe von Heim[20]) durch Verwendung einer klaren doppelt konzentrierten Bouillon auszugleichen; dass ein solcher Agar infolge seines hohen Erstarrungspunktes nur die Aussaat von Sporen, nicht aber vegetativer Zellen gestaltet, erwies sich als unwesentlich. Der Gefahr einer Eintrocknung begegnete ich nicht durch Einstellung in eine feuchte Kammer, weil bei der raschen Verdunstung die sich wieder kondensierenden Dämpfe mit Vorliebe auf der Agarfläche sich niederschlagen und sowohl durch Verwischung der Konturen das optische Bild der Kolonien trüben als auch eine rasche Rasenentwicklung begünstigen, sondern durch Einstellung eines mit Wasser gefüllten Schälchens in den Brutschrank selbst, dessen Dampfspannung durch die Luftzirkulation sich von selbst regulierte. Die von Globig empfohlene Verwendung der gekochten Kartoffel ferner empfiehlt sich sehr, zumal man gegen den Nachteil der ungekochten, welche durch eine rasche Verhärtung ihrer Oberfläche bei 62° das Bakterienwachstum beeinträchtigt, nur eine geringe Farbenveränderung eintauscht; die Milch wurde wegen der ungemeinen Resistenz der Sporen 30 Minuten im Autoklaven bei 0,5 Atmosphären Überdruck sterilisiert.

Da nun bei den ersten Versuchen, erhitzte Stühle sofort zur Aussaat zu benützen, keine oder nur selten

Kolonien thermophiler Bakterien auf den Schalen sich zeigten, glaubte ich mich zur Anlegung von Vorkulturen berechtigt; es wurden nicht zu kleine Mengen des zu untersuchenden Materials ($^1/_2$—1 gr) in Bouillon aufgeschwemmt und 24—48 h zur Anreicherung in den Brutschrank gestellt, darnach Petrischalen geimpft oder gegossen; dann kamen bei 62° am folgenden Tage fast stets Kolonien zur Entwicklung, die schon auf der Agarschale gewöhnlich eine Trennung in zwei unten beschriebene Arten gestatteten. Diese zeigten folgende gemeinsame Merkmale.

Was ihre Ansprüche an die Temperatur betrifft, so liegt das Optimum, wie ihr rapides Wachstum zeigt, bei ungefähr 62°; als Minimum ist wohl die Körpertemperatur zu betrachten, bei der unter anaëroben Bedingungen Agarstrichkulturen von Bacillus thermophilus α eine langsame Entwickelung mit lebhafter Sporulation zeigte; nicht selten jedoch konnte auch bei Bacillus thermophilus β ein aërobes Wachstum beobachtet werden; impfte ich ferner beide Arten auf Kartoffel, so blieben die Röhrchen offenbar aus Abneigung dieser Bakterien gegen saure Reaktion steril. Während sie die alkalische Bouillon rasch trübten und auf Traubenzuckerbouillon Säure bildeten, liessen sie die Milch stets unverändert.

Bacillus thermophilus α.

A. i. nl. 80°—40°*). Ip. R. +

1. mikroskopisch:

unbewegliche Stäbchen, meist einzeln oder in kurzen Fäden; grosse, stark glänzende, mittelständige, die Mutterzelle auftreibende Sporen; reichliche Sporulation.

*) Der Beschreibung der einzelnen Bakterien gehen stets die von Heim[21]) angegebenen Zeichen für konstante Unterschei-

2. Agarplatte: a) makroskopisch: teils homogener flacher, gelblicher, nicht glänzender Rasen, teils 1 bis 3 mm grosse runde bis rundliche Kolonien.

b) mikroskopisch: (Leitz Obj. 2, Ocul. 2) in der Mitte gelblich-braun; der schmale, farblose Rand selten wellig gebuchtet, grenzt sich nach aussen ziemlich scharf ab. Zeichnung: ein Gewirr feinster Fäserchen.

3. Bouillon: rasche Trübung unter Bildung eines reichlichen, wolkig-flockigen Bodensatzes bei unveränderter Reaktion; ebenso Milchzuckerbouillon. Traubenzuckerbouillon nach 3 Tagen deutlich sauer.

Bacillus thermophilus *β*.

A. i. nl. 60°—40°. Ip. R. +

1. mikroskopisch: unbewegliche, schmale Stäbchen, meist in kurzen Verbänden liegend; mittelständige, die Zelle clostridiumartig auftreibende Sporen; geringe Sporulation.

2. Agarplatte: a) makroskopisch: mässig glänzende braungelbliche Kolonien von verschiedener Form, Umrandung und Grösse (1—5 mm).

b) mikroskopisch: hellbräunlich ohne Zeichnung.

3. Bouillon: ähnlich, wie bei Bacillus thermophilus *α* doch rascheres Eintreten der sauren Reaktion auf Traubenzuckerbouillon.

Auf einen Vergleich der beiden Thermophilen mit bereits von früheren Autoren beschriebenen glaube ich schon deshalb verzichten zu können, weil weder bei Globig noch Rabinowitsch Angaben über thermophile

---

dungsmerkmale voran, weil bei Benützung der darauf sich gründenden Tabelle mir eine rasche und sichere Orientierung über bereits beschriebene Arten wesentlich erleichtert wurde.

Arten, welche auf Kartoffel kein Wachstum zeigen, zu finden sind.

Es war mir nicht möglich, die Zahl von 6 Versuchen über diese Gruppe zu steigern, da der Schwerpunkt der Arbeit wegen der grösseren praktischen Wichtigkeit (s. ob.) in einer Beschreibung der bei 37° üppig wuchernden, sporentragenden Aërobier, insbesondere der peptonisierenden Arten, liegen sollte.

Es schien anfänglich schwierig, eine geeignete Methode zu deren Isolierung ausfindig zu machen. Färbt man ein Ausstrichpräparat von frischen Faeces mit Karbolfuchsin, so glückt es der mikroskopischen Beobachtung selten, mit Sicherheit einiger Sporen habhaft zu werden, falls man sich nicht durch hellere Lücken, welche bei Behandlung mit diesem Farbstoff ja gerne entstehen, täuschen lässt. Beachtet man nun die Angaben von Gilbert und Dominici[22]), dass im Gegensatz zum Dünndarm im Dickdarm jene Bakterien, welche die Gelatine nicht verflüssigen, überwiegen, beachtet man ferner die Erfahrung von Eberle[23]), dass nur ein verschwindend kleiner Teil jener Bakterien, welche im mikroskopischen Bilde sichtbar sind, auf der Platte zur Entwickelung gelangen, zieht man ferner die zeitlichen Verhältnisse meiner Untersuchungen in Betracht, so erscheint die Aussicht, durch Aussaat des Kotes auf Gelatine und Agar eine richtige Vorstellung über Formen und Zahl der zu untersuchenden Aërobier zu bekommen, relativ gering. Versucht man die Keime des ungekochten Kotes mit Hilfe des Plattenverfahrens zu trennen, so beherrschen Arten des sog. Bacterium coli, einzelne Kolonien von Koccen und Sarcinen das ganze Bild. Das naheliegende Verfahren andererseits, dieser Überwucherung durch Abtötung der nicht sporen-

tragenden Formen vorzubeugen, erscheint vorerst nach der folgenden Angabe Lübberts[24]) über die Sporen eines toxinbildenden Aërobiers nicht rationell: „Nach den schon vor Jahren im hiesigen Institut ausgeführten zahlreichen Untersuchungen dürfte es aussichtslos sein, mit frischen erhitzten Stühlen zu arbeiten, um auf Sporen zu fahnden, weil er in der Milch ausserordentlich wenig Sporen bildet, und weil, wenn überhaupt solche vorhanden sind, ihnen bei weitem nicht die Resistenz eigen ist, wie wir sie von den ursprünglich in die Milch hineingelangten kennen; ich habe Sporen gehabt, welche nicht widerstandsfähiger waren, als vegetative Zellen.“ War es schon ohne weiteres äusserst unwahrscheinlich, dass die gegen Hitze so enorm widerstandsfähigen Sporen durch die Darmsäfte eine solche erhebliche Abschwächung erleiden könnten, so zeigten eigene Versuche bald, dass der Nachweis der Dauerformen im allgemeinen wohl gelingt auch bei Verarbeitung erhitzte Stühle durch Anreicherung mittels Vorkulturen in Milch. Die Gefahr, dass diese Methode den Untersucher im Stiche lassen könnte, wenn nämlich nur vegetative Zellen einer Art vorhanden oder nur äusserst wenig Sporen gebildet sind, lässt sich wohl durch eine unten angegebene Kombination der Untersuchungstechnik vermeiden.

Die Anlegung von Vorkulturen nun erwies sich mir als unumgänglich, da die Versuche erhitzten Stuhl sofort zur Aussaat zu benützen, sehr oft ein vollkommen negatives Resultat hatten, entsprechend der geringen Sporenzahl, die ich bei gesunden Kindern während der kälteren Monate nach einer analogen Mitteilung von Braun[24]) voraussetzen musste; diese Voraussetzung suchte ich auch experimentell zu beweisen. Bestimmte

Mengen Kotes und ausgeglühten feinen Sandes wurden in sterilem Schälchen innig mit einander zerrieben; ein abgemessener Teil der Mischung in einem abgemessenen Volumen Bouillon aufgeschwemmt und während 10 Minuten im Wasserbade auf 80° erhitzt; dann mit der Pipette nach eifrigem Rühren und Schütteln bestimmte Mengen entnommen und mit 10 ccm Agar vermengt und unter aëroben Bedingungen bei 37° in den Leutschrank gestellt. Da die ersten Versuche infolge allzugrosser Verdünnung negativ waren, nahm ich zwei weitere in Zwischenräumen von 14 Tagen unter ungefähr gleichen äusseren Temperaturverhältnissen mit je $^1/_4$ gr erhitzten Kotes unter Modifizierung obiger Methode vor und sah nach 48 Stunden auf Agar eine Entwickelung von 12, resp. 7 Kolonien. Wenn auch ohne weiteres zugegeben werden muss, dass solchen Zählungen nur ein äusserst bedingter Wert zukommt, so erscheinen diese Resultate auch deshalb erwähnenswert, weil vor dem ersten Versuch das Kind mit sogenannter „steriler" Soxflettmilch, vor dem zweiten mit einfach abgekochter ernährt wurde.

Greife ich wieder auf die Technik der Isolierung der einzelnen Arten zurück, so gestaltete sie sich bei der Mehrzahl der Versuche folgendermassen:

Da ausnahmslos die Reaktion des Kotes sich mindestens als amphoter, gewöhnlich jedoch als leicht sauer zeigte, wurde versucht durch auf Phenolphtalëin neutrale Bouillon die Säure abzustumpfen, um einerseits ein Ausfallen des Milchkasëins bei Anlegung der Vorkultur anderseits eine Beeinträchtigung des Bakterienwachstums zu verhüten; darauf wurden nicht zu geringe Quantitäten der neutralisierten Mischung (5-10-15 grosse Ösen) anfänglich 10 Minuten nach dem ersten

Aufkommen, späterhin während 10 Minuten auf 80° erhitzt nach Überimpfung in sterile Milch. Die letztere Methode der Erhitzung erwies sich mir zweckmässiger weil durch einen intensiveren Kochprozess die Kotpartikel sich leicht zusammenballen und an der Oberfläche unter Einfluss von geronnenem Eiweiss geradezu Kruftenbildung zeigen können, sodass mir dadurch nicht selten eine längere Sterilität der Milch vorgetäuscht wurde. Die Röhrchen wurden hierauf zwecks Anreicherung bei 37° gehalten und nachdem die Milch die Zeichen einer makroskopischen Veränderung darbot, was je nach Einsaat und Sporenzahl in 1—6 Tagen eintrat, Petrischalen gegossen. Zur Erleichterung der Arbeit und Ersparnis an Material hielt ich es für vorteilhaft, mich vor der Aussaat durch Anfertigung eines mikroskopischen Präparates über den ungefähren Reichtum an Keimen zu orientieren. Bei jedem Versuch wurden natürlich auch Kotpartikel sofort nach Abtötung der vegetativen Zellen auf Agarschalen geimpft, bei der grossen Mehrzahl sofortige Aussaaten ungekochten Kotes vorgenommen und Vorkulturen damit angelegt, um eventuell vegetativen Zellen Zeit und Gelegenheit zur Sporulation zu geben — einem Verfahren, dem ich die Auffindung des Bacillus k verdanke. Wenn auch eine Unterscheidung der einzelnen Arten mit Hilfe der Agarschale schwierig ist, so gelingt sie doch durch Anlegung von Reinkulturen in Petrischalen, wobei die einzelnen Phasen der Entwickelung und die nicht selten je nach der Lage an der Oberfläche oder in der Tiefe wechselnden Bilder festgehalten und beschrieben werden können. Weiterhin ergiebt auch das Verhalten auf Kartoffel, Bouillon und Gelatineplatte wichtige Anhaltspunkte und Unterscheidungsmerkmale. Das Ergebnis

von 12 Untersuchungen nun war bei Würdigung aller dieser Verhältnisse die Züchtung von Reinkulturen 13 differenter Bakterien; das charakteristische Verhalten dreier Arten, die Milch unter Säurebildung zur Gerinnung zu bringen, das Coagulum aber unverändert und ungelöst zu lassen, gestattet mir eine Teilung in zwei Untergruppen.

I. Fakultativ anoërobe milchsäurebildende Bacillen.

Bacillus *α* (A. m. Jp. R. +)

1. mikroskopisch: bewegliche, schlanke Stäbchen, 5—10mal länger als breit; etwas schmäler als die Milzbrandbacillen; mittelständige oder leicht endständige Sporen, reichliche Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob etwas besser als anaërob.

3. Agarplatte: makroskopisch: punktförmig bis $^1/_2$ cm grosse Ansiedlungen; die grösseren innen etwas erhaben, graugelb, nach aussen durchscheinend, nicht glänzend. Ränder mit zarten, tiefen Einschnitten.

mikroskopisch: einerseits tiefliegende Kolonien, dunkelgraugelblich mit kurzen, pilzartig angeordneten Ausläufern anderseits oberflächliche mit dunkelbraunem Zentrum und unbestimmt mosaikartiger Zeichnung, nach aussen zu hellbraun und nach dem Rand zu farblos werdend; dieser löst sich (Obj. 3, Ocul. 2) in ein Gefüge streptococcenartig Anordnung auf, wobei aber die Maschen nicht aus Punkten, sondern aus feinen Strichelchen und Linien bestehen; einzelne Lappen grenzen sich durch schmale, mässig tiefe Einkerbungen ab.

4. Agarstrich: Mässig dünne, trockene Haut mit hauptsächlich querverlaufenden, zarten, blätterrückenartigen Runzeln überzieht das klare Condenswasser.

5. Agarstrich: geringere Wachstumsintensität; an der Stichstelle kleine, erhabene, gelbliche, runzliche Partie. Zuckeragar: Oberfläche ganz bewachsen; breiter bandförmiger Strich; nirgends Gasblasen.

6. Gelatineplatte: makroskopisch nach 18 Stunden bis 2 mm grosse, dünne, weisslichgraue, tellerförmig eingesunkene Kolonien.

mikroskopisch: tiefliegende hellbraun und rundlich mit dunklerer Randzone und hellerem Innern, ohne deutliche Zeichnung; aufliegende zeigen netzartigen Charakter; meist farblos, gegen die Mitte zu leicht gelblich; kleiner Nabel, der auch fehlen kann.

7. Gelatinestrich: äusserst langsame, cylindrische Verflüssigung; am Boden des Cylinders stets dicker, gelblich-weisser flockiger Niederschlag.

8. Milch: nach 24 Stunden Caseïn käsig geronnen ausgefüllt; wenig anfänglich klares Serum auspressend. Reaktion auf Lakmus bereits deutlich sauer; das Coagulum bleibt unverändert.

9. Bouillon: nach 36 Stunden Bildung einer ziemlich resistenten, weisslichen Kahmhaut; feinflockige Trübung namentlich auf Zuckerbouillon, worauf niemals Häutchenbildung. Reaktion der gewöhnlichen Bouillon auf Phenolphtalein, der Tauben- und Milchzuckerbouillon auf Lakmus sauer.

10. Kartoffel: braunlich-weisser, später mehr rötlich-brauner, zart runzeliger Belag.

Bacillus *β*.

(A. m. Ip. R. $\dot{+}$)

1. mikroskopisch: äusserst lebhaft bewegliche, sehr kleine, aber relativ dicke Stäbchen, gewöhnlich in kürzeren Verbänden beisammenliegend; stark längsovale,

gewöhnlich mittelständige Sporen; mässig reichliche Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob, wie anaërob.

3. Agarplatte: makroskopisch: teils homogener, matter, gelblicher Rasen, teils punktförmige bis 4 mm grosse Kolonien, wenig erhaben, die kleinern mehr rundlich, die grösseren von unregelmässiger Form; mikroskopisch: braungelbe, im Zentrum etwas hellere Kolonien von undeutlicher Zeichnung mit schmalem, hellerem, scharfen Rand.

4. Agarstrich: Condenswasser stark getrübt; keine eigentliche Häutchenbildung; wenig erhabener, bräunlich-gelber, flüssig-schmieriger Belag.

5. Agarstich: Stichkanal bis in die Tiefe bewachsen; starkes Oberflächenwachstum. Traubenzuckeragar: keine Gasblasen.

6. Gelatineplatte: zirka 2 mm grosse, tellerförmig eingesunkene, im Innern fast farblose, am Rande mehr gelblich-braune Kolonien; mikroskopisch: im Centrum ein Spinngewebe feinster Fasern mit einzelnen dunkler braunen, unregelmässigen Inseln; die Peripherie bildet eine dunklere, nach aussen sich scharf abgrenzende Zone ohne erkennbare Struktur.

7. Gelatinestich: langsame, cylindrische Verflüssigung; an der Oberfläche zerrissenes, grauweisses Häutchen; der Inhalt stark wolkig getrübt.

8. Milch: nach 36 Stunden völlig geronnen bei saurer Reaktion; das käsige Gerinsel bleibt unverändert.

9. Bouillon: diffuse Trübung ohne Kahmhautbildung; Reaktion auf Trauben und Milchzuckerbouillon sauer.

10. Kartoffel: schmieriger, fettig glänzender Belag mit minimaler gelblicher Faltenbildung.

Bacillus γ.

(A. m. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: kurze, plumpe Stäbchen, meist einzeln, seltener in kurzen Verbänden, mit ziemlich rascher Eigenbewegung; leicht endständige, längsovale Sporen; reichliche Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob wie anaërob.

3. Agarplatte: makroskopisch: teils 1—3 mm grosse runde Kolonien; die oberflächlichen ziemlich erhaben, glänzend, grauweiss, die anscheinend tiefliegenden von mattgrauer Farbe teils flachere blattförmige Kolonien, nicht selten mit einer strahlichen Runzel im Innern und einem dünnern gebuchteten, fast farblosen Saum.

mikroskopisch: 3 verschiedene Bilder; die oberflächlichen Kolonien in der Mitte fast homogen dunkelgrauschwarz ohne erkennbare Zeichnung; vom Zentrum ausgehend sowohl dickere, knotige, dunklere, als auch zahlreiche dünnere, eng verfilzte wurzelförmige Ausläufer; tiefliegende stellen ein netzartig verschlungenes Faserwerk dar, des öfteren mit einer dunkleren grauschwarzen peripheren, nicht selten nur einen Sektor bildenden, und einer zentralen schwärzlichen Zone; am Rand ein Kranz kurzer verfilzter Fasern; die grossen blattförmigen Kolonien zeigen ein grau-schwarzes Innere mit einer strahlichen Runzel und eine hellere aus feinsten verschlungenen Fäserchen bestehende Randzone.

4. Agarschräg: Das klare Condenswasser ist mit derber, grauweisser Haut überzogen; der Belag die ganze Breite des Röhrchens einnehmend, flach, lederartig derb, nur mit Mühe und Agarteilchen ablösbar.

5. Agarstich: Einstichstelle nicht selten durch weissliche Runzel markiert; der Stichkanal breit be-

wachsen, nach unten sich verjüngend mit dunkler gelblich sich abhebenden Axencylinder. Traubenzuckeragar: Stichkanal nach unten keulenförmig anschwellend; einzelne Gasblasen.

6. Gelatineplatte: nach 48 Stunden 3—4 mm grosse, runde bis rundliche, leicht napfförmig eingesunkene Kolonien.

mikroskopisch: Die Mitte gelblich-weiss, ein feinstes Netzwerk darstellend mit dunkleren Buckeln; der schmale hellere Rand anfänglich mit kurzen knotigen Ausläufern, später mit dunkleren peripherischen Zone, welche feinste Auslaufer aussendet.

7. Gelatinestich: an der Oberfläche weissgraue, ziemlich dicke und sehr resistente, gebuchtete Haut mit einem Kranz feinster Ausläufer; längs des Stichkanals tannenbaumförmiges Wachstum; dann erst sehr langsame cylindrische Verflüssigung.

8. Milch: nach 36 Stunden das Casein ziemlich klein-flockig geronnen, in trübem Serum suspendiert. Reaktion nach 48 Stunden deutlich sauer; die Gerinsel bleiben unverändert.

9. Bouillon: grau-weisse, faltig gebuchtete, zähe Kahmhaut; der Inhalt nur durch wenige Flocken getrübt; geringer wolkiger Bodensatz. Reaktion unverändert, auf Trauben- und Milchzuckerbouillon sauer.

10. Kartoffel: nach 24 Stunden schöner krystallinischer Belag von zart-rosa Farbe mit hübschen aus einer helleren, schleimige, kurze Fäden ziehenden Masse geformten Perlen; stehen die Röhrchen längere Zeit bei Bruttemperatur, so vertrocknen die Perlen rasch und legen sich in rötliche Falten und die Farbe verblasst mehr und mehr.

II. fakultativ anaërobe, die Milch peptonisierende Bacillen.

Bacillus δ.

(A. m. p. Ip. R. +)

1. sehr kleine, lebhaft bewegliche Stäbchen mit abgerundeten Enden; Auftreibung der Mutterzelle durch die leicht entständige Spore. Ziemlich reichliche Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: anaërob etwas besser als aërob.

3. Agarplatte: teils homogener flacher Rasen mit stumpfzackigem Rand teils 1—5 mm grosse Colonien, in der Mitte gelblich-weiss, mässig glänzend und etwas erhaben, die grösseren durch ihre flacheren Ausläufer sternblumenförmig.

mikroskopisch: im Innern gelblich, ohne deutliche Zeichnung mit farblosem helleren, scharfrandigen Saum, die grösseren mit den sternblumenartigen Ausläufern fein grau-gelblich chagriniert.

4. Agarschräg: breiter, flacher, schleimig-schmieriger Belag mit gelapptem Rand. Condenswasser trüb, mit dünnem zarten Häutchen bedeckt; in den unteren Partien geringe, niedrige Faltenbildung.

5. Agarstich: An der Einstichstelle nicht selten kleine, strahliche Runzel; ziemlich geringe Oberflächenausbreitung; Stichkanal bis in die Tiefe bewachsen. Zuckeragar: keine Gasblasen.

6. Gelatineplatte: nach 48 Stunden 1—3 mm grosse Kolonien.

mikroskopisch: die etwas hellere, gelblich-braune, fein granulierte Mitte färbt sich nach der Peripherie zu dunkler, die durch ihre eigenartige Schichtung von konzentrischen helleren und dunkleren Zonen auffüllt;

letztere verlaufen teils wie schmale Bänder teils wie dunklere Linien; die Randzone wird durch senkrecht sie teilende, dunklere Stränge intensiver bräunlich und sendet kurze, gestutzte Fasern zu einem gebuchteten, farblosen Saum.

7. Gelatinestich: rasche cylindrische Verflüssigung; Häutchenbildung.

8. Milch: nach 24 Stunden oft keine Veränderung; nach 36 Stunden Caseïn grob-flockig ausgefallen; 2 mm breite, stark getrübte Serumzone; später rasches Fortschreiten der Peptonisierung und Übergang der amphoteren in leicht saure Reaktion.

9. Bouillon: Zarte Kahmhaut; Inhalt diffus getrübt; geringer wolkiger Bodensatz; Reaktion nach 3 Tagen sauer; ebenso Trauben- und Milchzuckerbouillon.

10. Kartoffel: ziemlich flaches, unregelmässiges Netzwerk, gebildet von sich verflechtenden, gelblichen niederen Falten.

Bacillus ε.

(A. i. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: unbewegliche, kräftige Stäbchen von der Grösse der Milzbrandbacillen, oft längere Ketten bildend. Ovale, leicht entständige Sporen; die Mutterzelle stark abgerundet; reichliche Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob etwas besser als anaërob.

3. Agarplatte: 1—8 mm grosse, etwas erhabene, fein chagrinierte, grau-weisse, matte Ansiedelungen.

mikroskopisch: teils milzbrandähnliche Zeichnung, aber viel gröber, dicker und graubraun teils pilzartige, wurzelförmige Kolonien, mit schwarzbraunem Zentrum und verschnörkelten Ausläufern.

4. Agarstrich: Condenswasser klar; dieses und die ganze Fläche des Röhrchens überzieht ein matter chagrinierter, grau-weisser Belag.

5. Agarstich: Stichkanal in der ganzen Länge bewachsen; grau-weisser, fast die Glaswandung erreichender, schmieriger Belag.

6. Gelatineplatte: bis 2 mm grosse, grauweisse Kolonien mit napfförmiger Verflüssigung in etwa 1 mm Umkreis.

mikroskopisch: trübes, grau-braunes Innere, nach aussen zu heller werdend, ein dichtes Gewirr von Fäden darstellend; der Rand mit kurzen Härchen pelzartig besetzt.

7. Gelatinestich: Die Kolonie tellerförmig einsinkend; Verflüssigung anfänglich in Form eines stumpf zulaufenden konischen Trichters, später mehr cylindrisch; an der Oberfläche ziemlich derbes, grau-weisses Häutchen; der Inhalt wolkig getrübt.

8. Milch: nach 24 Stunden 2 mm breite Serumzone; mässig rasch fortschreitend; Serum fast undurchsichtig getrübt. Reaktion unverändert.

9. Bouillon: Nach 24 Stunden beginnende Häutchenbildung; geringe wolkige Trübung; geringer Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: schmutzig grau-weisser, wenig erhabener, leicht fettig glänzender Belag.

Bacillus ϑ.

(A. m. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: mässig rasch bewegliche Stäbchen von der Dicke der Milzbrandbacillen, aber etwas kürzer; gewöhnlich einzeln oder zu zweien, selten längere Fäden bildend. Sporen

($^2/_3$ der Stäbchenlänge) mittel oder leicht endständig; reichliche Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob besser als anaërob.

3. Agarplatte: 1—3 mm grosse Kolonien, gelblich-weiss, leicht erhaben, mit unregelmässigen Rändern; parallel zu diesen etwas erhöhte Zone in der Mitte; deutlicher bei älteren Kolonien.

mikroskopisch: sowohl kleinere, tiefliegende Kolonien mit dunkelbraunem, oft fast homogen schwarzem Zentrum und davon ausstrahlend ziemlich langem Fadengewirr als auch hochliegende mit dunkelgrau-gelber bis dunkelbräunlicher innerer Partie; am Rande schlierige breite Zone, oft mit milzbrandähnlichen Ausläufern; isolierte Partien dieser Auslaufer befinden sich in Protensartiger Anordnung zwischen den grossen Kolonien (Inseln ausgeschwärmter Teile).

4. Agarstrich: breiter, graugelblich-weisser, saftig glänzender Rasen mit etwa 2 mm breiter, dünner, oft wurzelförmige Ausläufer treibenden Zone; Kondenswasser getrübt; Häutchenbildung.

5. Agarstich: Stich bis in die Tiefe deutlich; die ganze Oberfläche bis an den Rand bewachsen. Zuckeragar: ohne Gasblasen.

6. Gelatineplatte: 1—2 mm grosse napfförmig einsinkende Kolonien mit einer Verflüssigungszone von ca. 4 mm Durchmesser.

mikroskopisch: Die Farbe grün-weiss mit einer dunkelgraubraunen bis bräunlich-gelben innere Partie und einer mehr farblosen Randzone von filzartigem Aussehen und ganz kurzen dichten Härchen am Rande.

7. Gelatinestich: Kolonie anfänglich linsenförmig einsinkend; Verflüssigung dann in Form eines

stumpfen konischen Trichters, später mehr cylindrisch; auf der Oberfläche ein weiss-graues, zerrissenes Häutchen; der Inhalt flockig getrübt.

8. Milch: Ziemlich rasche Peptonisierung; Serum gleichmässig schwach getrübt; Caseïnrest grobflockig am Boden. Reaktion unverändert.

9. Bouillon: nach 2—3 Tagen nicht selten Kahmhautbildung; Inhalt diffus getrübt; beim Schütteln Wolkenbildung. Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: schmieriger, grauweisser, glänzender Belag.

Bacillus η.

(A. m. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: sehr lebhaft bewegliche, mittelgrosse, meist einzeln seltener zu zweien liegende Stäbchen; schmäler als die Milzbrandbacillen; stark längsovale mittelständige oder leicht endständige Sporen; sehr geringe Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob etwas besser als anaërob.

3. Agarplatte: teils mässig erhabene, mattglänzende, graugelblich-weisse Kolonien von 2—3 mm Durchmesser teils anscheinend tieferliegende bis $^1/_2$ cm grosse, schleierartige Ausbreitungen mit zentralem grauweissen Gerüst.

mikroskopisch: teils im Innern dunkelgelbbraune Kolonien mit einer breiten gebuchteten helleren Randzone; Zeichnung: ein Netzwerk feinster Fasern; teils dunkelgraubraune mit dichterem Knoten in der Mitte, Gewirre pilzartig angeordneter verfilzter Fäden (wurzelform).

4. Agarstrich: Das leicht getrübte Condenswasser mit Häutchenüberzug; der Belag erhaben,

wellig gebuchtet, schmierig, mit rotbraunen Falten bedeckt.

5. Agarstich: Stichkanal ziemlich breit bis in die Tiefe bewachsen; im obersten Teil geringe Ästchenbildung; Oberfläche fast ganz bewachsen. Zuckeragar: ohne Gasblasen.

6. Gelatineplatte: nach 48 Stunden ca. 3 mm grosse, rundliche, schalenförmig eingesunkene Kolonien.

mikroskopisch: bräunlichgelb granuliertes Innere mit einzelnen dunkleren unregelmässigen Schatten und einer gleichmässigen dunkelbraun-schwärzlichen Randzone, welche kurze feinste Auslaufer nach einem farblosen schmalen Saum sendet. Mit dem Fortschreiten der Verflüssigung hellt sich die Farbe im Innern mehr und mehr auf und die periphere dunklere Zone verschmälert sich.

7. Gelatinestich: Trichterförmige Verflüssigung, später mehr cylindrisch; die Einstichstelle markiert ein 2—3 mm grosses, nach dem Zentrum sich verdickendes, zartes, grau-weisses Häutchen mit gelblichem Nabel.

8. Milch: rasche Peptonisierung der Milch; Serum hauptsächlich in den oberen Schichten stark wolkig getrübt; am Boden stets noch geringer Caseïnirest. Reaktion unverändert.

9. Bouillon: gelbrötliches, leicht in zarte Flocken zu zertrümmerndes Häutchen. Bouillon mässig getrübt; geringer flockiger Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: grau-gelblich-weisser Belag mit später sich rotbraun färbenden Runzeln.

Bacillus ε.

(A. i. pept. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: unbewegliche, ziemlich schmale, mittelgrosse Stäbchen; eiförmige, mittelständige Sporen; geringe Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: anaërob auf Agar schräg breiteres, aber flacheres Wachstum.

3. Agarplatte: bis 1 cm grosse, trockene, flache, silbergrau-weisse Kolonien mit dickerem leicht gefalteten Zentrum und (nicht selten) hellerer, gebuchteten Randzone.

mikroskopisch: Im Innern ist die Kolonie schön grau-schwarz mosaikartig gezeichnet oder wie aus kleinsten Krümelchen bestehend zusammengesetzt. Der schmale Rand fast farblos und ohne Zeichnung.

4. Agarstrich: Condenswasser klar mit Häutchenbildung; der ziemlich breite, wenig erhabene, trockene Belag zeigt rötlich-braune Faltenbildung.

5. Agarstich: Stichkanal bis in die Tiefe bewachsen; im oberen Teil kleine Ästchen tragend; Oberflächenwachstum die Glaswandung erreichend. Zuckeragar: keine Gasblasen.

6. Gelatineplatte: 1—3 mm grosse, kaum eingesunkene Kolonien, bräulich-gelblich, mit hellerem Schleierkranz.

mikroskopisch: die Mitte dunkelbräunlich, fast schwarz mit undeutlicher Zeichnung; der Rand hellbraun mit schönen farblosen Schlieren.

7. Gelatinestich: zartes Häutchen; Kolonie trichterförmig einsinkend; Verflüssigung im wesentlichen cylindrisch. Inhalt leicht flockig getrübt.

8. Milch: ziemlich langsame Peptonisierung; das Serum scheidet sich in eine obere fast undurchsichtig

gedrübte und untere hellere Zone; minimaler Bodensatz. Reaktion unverändert.

9. Bouillon: ziemlich dicke, rötlich-braune, resistente Kahmhaut; Inhalt fast klar; kein Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: bräunlich-weisse, später mehr rötlich-braune Faltenbildung; diese von zähschmieriger, klebriger Konsistenz.

Bacillus ϰ.

(A. m. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: ausserordentlich lebhaft bewegliche, kurze, plumpe Stäbchen, einzeln oder in kleineren Verbänden; kleine endständige Sporen; äusserst minimale Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: anaërob etwas besser; doch dann niemals Sporenbildung nachzuweisen.

3. Agarplatte: punktförmige bis 1 cm grosse grauweisse Kolonien; die grösseren mit ziemlich erhabenen, feucht glänzendem Zentrum und matterer, flacherer, fein lappiger Begrenzung.

mikroskopisch: die kleineren aus dichten schwarzen, warzigen Gebilden zusammengesetzt, wodurch ein ganz unregelmässiger Rand der im Allgemeinen rundlichen Kolonie entsteht; die grösseren mit einem unregelmässigen, dunkelbraungelbem Zentrum und mit zahlreichen, sehr tief gelappten, astförmig sich verzweigenden Ausläufern von gelblich-brauner Farbe, welche zahlreiche kleinere, hellere Flecken, hauptsächlich bei den grössten Kolonien, unterbrechen.

4. Agarstrich: Condenswasser getrübt mit geringem Bodensatz und Häutchenbildung. Der ziem-

lich erhabene und an den Rändern steil abfallende Belag mit rötlicher Faltenbildung.

5. Agarstich: Stichkanal bis in die Tiefe sichtbar; an der oberfläche, hauptsächlich vom Zentrum ausstrahlende, braunrote Runzeln und Falten.

6. Gelatineplatte: leicht napfförmig eingesunkene, 1—3 mm grosse Kolonien mit hellerem Innern und schmaler grauer Peripherie.

mikroskopisch: das bräunlich-gelbe Innere zeigt ein engmaschiges, verworrenes Netzwerk feinster Fasern; der Rand nicht selten eine konzentrische Schichtung von helleren und dunkleren Linien und einen schmalen, farblosen Saum.

7. Gelatinestich: Zarter Schleier auf der Oberfläche; trichterförmige, später cylindrische Verflüssigung; stark wolkige Trübung des Inhalts.

8. Milch: nach 24 Stunden keine deutliche, makroskopische Veränderung; dann rasche Peptonisierung; das Serum stark getrübt; die Reaktion unverändert.

9. Bouillon: grau-weisses, zartes Häutchen; Bouillon fast klar; geringer flockiger Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: Ziemlich erhabener, grau-gelblich-weisser Belag mit vielen, später sich braun-rötlich färbenden Runzeln.

Bacillus λ.

(A. m. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: mässig rasch bewegliche Stäbchen, etwas kleiner und schmäler als die Milzbrandbacillen, einzeln oder in kurzen Verbänden; geringe gewöhnlich entständige Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: anaërob etwas besser als aërob.

3. Agarplatte: teils flacher, weisslich-grauer Rasen mit breiten, oft astförmig sich verzweigenden Ausläufern am Rande teils punktförmige bis 3 mm grosse runde bis rundliche Kolonien, ziemlich erhaben mit einer scharf abgegrenzten helleren Landzone.

mikroskopisch: das gelbliche, dunklere Buchten zeigende Innere fällt mit einer gelblich-weiss granulierten Randzone zu einem schmalen, nach aussen sich scharf abgrenzenden Saum ab.

4. Agarstrich: mattgrauer, mässig erhabener, leichtrötlich weiss-grauer gefalteter Belag überzieht mit einem dünnen Häutchen das klare Condenswasser.

5. Agarstich: Stichkanal bis in die Tiefe sichtbar, auf Zuckeragar deutlicher; Oberflächenwachstum ziemlich gering.

6. Gelatineplatte: grauweisse bis 1 cm grosse, runde bis rundliche, schalenförmig eingesunkene Kolonien.

mikroskopisch: das Innere leicht gelblich-braun gekörnt; die gleichmässige, schmale Randzone zeigt abwechselnd hellere und dunklere bräunlich-gelbe Bündel kurzer Fasern, die in einen ganz schmalen farblosen Saum eilen.

7. Gelatinestich: Sehr rasche strumpfförmige Verflüssigung; dünner, grauer Schleier an der Oberfläche; der Inhalt diffus ohne sichtbare Flocken getrübt; am Boden ein grösserer weislicher Ballen.

8. Sehr rasche Peptonisierung der Milch bei diffus getrübtem Serum und unveränderter Reaktion.

9. Bouillon: dünne, doch ziemlich resistente weissliche Kahmhaut, später sich leicht rötlich faltend. Bouillon ganz wenig diffus getrübt; minimaler Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: erhabener, stark rötlich-weiss gefalteter, zähklebriger Belag.

Bacillus μ.

(A. i. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: unbewegliche, sehr kleine und schmale Stäbchen, einzeln, seltener zu zweien und dreien; äusserst reichliche, mittelständige Sporen, die die Mutterzelle ziemlich auftreiben und ihre Enden abrunden.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob wie anaërob.

3. Agarplatte: 1—2 mm grosse kleinere, rund bis rundliche, ziemlich erhabene, nicht selten leicht gefaltete Kolonien und grössere (3—4 mm), aber flachere mit amöboiden Auslaufern.

mikroskopisch: braungelbe, warzige Kolonien mit breiten gewundenen wurmartigen Runzeln; der Rand infolge eines ganz schmalen Saums nicht ganz scharf.

4. Agarstrich: Das klare Condenswasser mit zartem Häutchen überzogen; der Belag braungelblich, ziemlich breit, wenig erhaben, mit kleinen mehr rötlichgelben Runzeln und Falten.

5. Agarstich: Stichkanal nicht ganz bis zur Tiefe bewachsen; Oberflächenwachstum üppig; stark rötlich gefaltet. Zuckeragar: keine Gasblasen.

6. Gelatineplatte: Den Kolonien von Bacillus η täuschend ähnlich und nur bei genauerem Vergleich durch das ganz hellbräunliche, fast farblose Innere zu unterscheiden.

7. Gelatinestich: Kolonie trichterförmig einsinkend; die Verflüssigung im allgemeinen cylindrisch; die Einstichstelle markiert ein kleines, ziemlich dickes, mit einer gelblichen Runzel bedecktes Häutchen von weiss-grauer Farbe; der Inhalt wolkig getrübt.

8. Milch: sehr langsame Peptonisierung; Serum diffus undurchsichtig getrübt. Reaktion unverändert.

9. Bouillon: Zartes, später sich faltendes, braunrötliches, an den Glaswandungen emporstrebendes Häutchen, mit einzelnen dickeren, niederen Runzeln entsprechenden Stellen; geringe flockige Trübung und Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: braun-rötlich-weisser, schmierig-klebriger, gekörnter und mit kleinen, dicken, wulstigen Fältchen versehener Belag.

Bacillus *v.*

(A. m. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: lebhaft bewegliche, in der Grösse sehr differierende, ziemlich dicke Stäbchen mit endständiger Sporulation; gewöhnlich einzeln liegend.

2. Sauerstoffbedürfnis: aërob besser als anaërob.

3. Agarplatte: 1—5 mm grosse, grau-weisse, mässig glänzende Ansiedelungen; kleinere rund- bis rundlich, nicht selten mit strahlicher Runzel im Innern teils grössere kolbig gelappte.

mikroskopisch: massige Kolonien von im ganzen gleichmässig braunschwarzem Ansehen; viele von ihnen lassen im Innern breite ringförmige Leisten erkennen, die sich durch ihre Lichtbrechung und hellgraue Farbe von dem braunschwarzen Untergrund markant abheben. Diese Leisten verzweigen sich von einem einzigen zentralen Ast Y-förmig nach verschiedenen Seiten und tauchen, nachdem sie die Hälfte der Kolonie durchlaufen haben, in deren Masse unter; der Rand der braun-schwarzen Kolonien, die tiefe, breite Lappen zeigen kann, ist heller und löst sich in dieser helleren Zone in kurze, dichtstehend drusige Gebilde auf.

4. Agarschräg: Das klare Condenswasser mit dünnem Häutchen bedeckt; breiter, grauweisser, mässig glänzender Belag mit Faltenbildung.

5. Agarstich: Oberflächenwachstum gering; Stichkanal nicht ganz bis zur Tiefe bewachsen. Zuckeragar: einige Gasblasen; Stich breiter.

6. Gelatineplatte: Im ersten Stadium treten bis 0,5 cm grosse braungelbe Kolonien auf mit gebuchtetem Rand und einzeln durch tiefere Furchen getrennten Buckeln; der etwas intensiver gelbliche Rand ist durch tiefe Einschnitte breit gelappt; indem zuletzt die Kolonie napfförmig einsinkt, umgiebt sich das bräunliche mit zahlreichen, kleineren, dunkleren Inseln und grösseren fast grünlich-gelb durchscheinenden Trümmern versehene Innere mit einem peripheren Ring bräunlicher, kurzer, eng verfilzter Fasern, welche die ziemlich breite, sie vom Innern trennende, fast farb- und strukturlose Zone durch ein zartes Gefüge ihrer Fasern stellenweise überbrücken.

7. Gelatinestich: Stich anfänglich nagelförmig, dann langsame cylindrische Verflüssigung; an der Oberfläche weiss-gelblicher Schleier; Inhalt diffus getrübt.

8. Milch: Langsame Peptonisierung; Serum getrübt; Caseïn fein flockig ausgefüllt am Boden; Reaktion unverändert,

9. Bouillon: Dünne grau-gelbliche, leicht zu zertrümmernde Kahmhaut; Bouillon nur durch wenige zarte Flocken getrübt; geringer wolkig flockiger Bodensatz; Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: trocken aussehender, gelblicher, zäher, leicht gekörnter, ziemlich erhabener Belag, nicht selten kleine Fältchen zeigend.

Bacillus ϱ.

(A. m. p. Ip. R. +)

1. mikroskopisch: lebhaft bewegliche, schlanke, schmale Stäbchen, fast stets einzeln, selten zu zweien und dreien (nie längere Fäden bildend); grosse, längsovale, mittelständige Sporen. Geringe Sporulation.

2. Sauerstoffbedürfnis: anaërob wie aërob.

3. Agarplatte: punktförmige bis 4 mm grosse Kolonien, flach, blass-grau, mit matten, dünnen, kurzen Ausläufern.

mikroskopisch: schwach graugelbliche, rundliche Ansiedelungen, aussehend, als wären sie aus einer zähflüssigen Masse geformt aufgetragen; nicht selten grössere Flächenausbreitung mit fast farblosem warzigen Gefüge und zungenförmigen, tief gelappten Ausläufern; eigentümlich, charakteristische, aber schwer zu beschreibende Kultur.

4. Agarstrich: Das getrübte Condenswasser mit gefaltetem Häutchen; trockene, mit rötlich-gelben Falten versehene dünne Haut.

5. Agarstich: Stichkanal bis in die Tiefe bewachsen; Zuckeragar: keine Gasblasen; Oberflächenwachstum: die grau-weisse Haut stark gerunzelt und gefaltet.

6. Gelatineplatte: teils kleinere Kolonien mit dunkelbraunem, fast schwärzlichen Zentrum und einer helleren Peripherie mit kurzen, kraussen Härchen teils stärker verflüssigende mit einer krümmerlichen und bräunlich-gelben, pelzartig kurzhaarigen Randzone.

7. Gelatinestich: ziemlich rasche, im allgemeinen cylindrische Verflüssigung; auf der Oberfläche dünnes, zartes, rötlich-graues Häutchen. Inhalt stark diffus getrübt.

8. Milch: Ziemlich rasche Peptonisierung. Serum diffus getrübt; als Bodensatz der Rest des grobflockig-geballten Caseïn. Reaktion unverändert.

9. Bouillon: derbe, tief gefaltete, rötlich-gelbe Kahmhaut, ein schönes Maschenwerk bildend. Inhalt klar; beim Schütteln mässige Wolkenbildung. Reaktion unverändert.

10. Kartoffel: grau-weisser, erhabener, gekörnter Belag, nicht selten mit mässiger Fältchenbildung und zäher Konsistenz.

Einigen zusammenfassenden Bemerkungen über diese ganze Gruppe sollen der Übersichtlichkeit halber noch Angaben über das Vorkommen von Anaërobiern vorausgeschickt werden.

Die Untersuchungen auf das Vorhandensein von Sporen der von Flügge beschriebenen 4 Arten geschah analog der von diesem Autor angegebenen Methode in folgender Weise. Bestimmte Mengen Kotes wurden auf Milch geimpft; eine Portion (Nr. 1) während 30 Minuten, eine zweite zur Auffindung der drei übrigen widerstandsfähigeren Formen $1^1/_2$ Stunden auf 100° im Wasserbad erhitzt; beide Röhrchen luftdicht verschlossen und bei 37° in den Brutschrank gestellt. Sind dann Sporen im Ausgangsmaterial vorhanden, so gerät die Milch binnen 24 Stunden in stürmische Buttersäuregährung. Während bei meinen Versuchen die Röhrchen Nr. 2 auch nach Tagen niemals Gasentwickelung, noch ranzigen, stinkenden Geruch zeigten, der die resistenteren Anaërobier kennzeichnet, war das Ergebnis der Proben Nr. 1 folgendes. Wurden geringe Mengen z. B. 1—5 Ösen einer Kotaufschwemmung in Bouillon auf Milch geimpft, so war das Resultat nur einmal ein positives, bei grösseren Quantitäten, ja bei gleicher Einsaat (0,2 gr)

bei demselben Säugling schwankend. Daraus lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass auch die Zahl der sporentragenden Anaërobier im Säuglingsdarm eine geringe ist und innerhalb dieser engen Grenzen während kurzer Intervalle noch varieren kann; nur mit dieser Einschränkung bestätigt sich die Behauptung Flügges, dass der Bacillus bulyricus Botkin stets in den Faeces auch nur wenige Tage alter Kinder vorhanden sei; die Zahl der Sporen ist so minimal, dass man bei direkter Aussaat erhitzten Kotes (bis 0,2 gr) und Einstellung der Platten in den Anaërobierapparat nicht selten auf seine reichverzweigten Kolonien vergebens fahndet und nur spärliche Ansiedelungen von Formen der Heubacillengruppe, zuweilen auch verkappter, bei 37° unter Luftabschluss gewucherter Thermophilen findet. Blieb aber bei der erwähnten Prüfung auf Anwesenheit von Sporen die Buttersäuregährung aus, so waren die Röhrchen nicht etwa in allen Fällen steril, sondern zeigten nicht selten eine langsame Peptonisierung; als Erreger dieser entpuppte sich mit 3 Ausnahmen, welche ausserdem noch die Isolierung von Bacillus ε und Bacillus ν gestatteten, der Bacillus ϑ. Der von mir gezüchtete Anaërobier nun bewies durch seine biologischen Eigenschaften die Identidität mit dem Bacillus Butyricus Botkin; es waren bewegliche, schlanke Stäbchen mit mittelständiger Sporulation, welche die Gelatine rasch verflüssigten, üppiges Wachstum und Gasbildung im Agarstich und die charakteristische Milchkultur zeigten.

Der naheliegende Versuch nun, auch einen Vergleich der oben beschriebenen sporentragenden Aërobier zu wagen mit den von Flügge aus Milch isolierten Formen, ist dadurch äusserst erschwert, dass einerseits die von diesem Autor angekündigte, zur Wiedererkennung not-

wendige, nähere Charakteristik noch aussteht, anderseits gerade die Gruppe der Heubacillen eine grosse Variabilität und zahllose Übergänge zeigt — ein Moment, welches die Thatsache vollauf erklärt, dass die Biologie fast sämtlicher von mir gefundenen Arten in jeder Beziehung niemals einer früheren Beschreibung genau entspricht. Anklänge an die 3 Milchsäureproduzierenden Bacillen α, β, γ fehlen gänzlich; höchstens ähnelt β dem stark giftigen Bacillus lactis 1., *[25]) von dem er sich aber wiederum durch Säurebildung und langsame Peptonisierung der Gelatine unterscheidet; der Bacillus γ unterscheidet sich scharf von allen früher beschriebenen Formen durch seine hübsche, charakteristische, rosarote Kartoffelkultur mit helleren Perlen, die wohl zu seiner Taufe „Bacillus rosaceus" berechtigt. Bacillus ϑ variert von dem typischen Subtilis durch den Glanz seiner Kartoffelkolonien und nähert sich so dem Bacillus pseudanthracis Burri;[26]) Bacillus ε ist im Gegensatz zum gewöhnlichen Heubacillus unbeweglich; auf nähere und weitere Beziehungen zu seiner ganzen Gruppe weisen genügsam Anklänge sämtlicher übrigen Bakterien hin; eine genauere Bestimmung ist solange noch unmöglich, als wir einer systematischen und methodischen Durchforschung der Subtilis-Vulgatusarten entbehren; nur das muss ich noch nachdrücklich betonen, dass sämtliche meiner Reinkulturen auf den einzelnen Nährböden konstante Typen zeigten und dass ich niemals eine solche Variabilität beobachten konnte, wie sie z. B. bei dem Bacillus mesentericus fuscus auf Kartoffel beschrieben ist.

Es erübrigen als Abschluss meiner Studien über die sporentragenden Formen, insbesondere der peptonisierenden noch Angaben über die Häufigkeit ihres Vor-

kommens. Das Ergebnis der einzelnen Versuche war die Isolierung von je 3—6 verschiedenen Arten. Während aber bei 12 Aussaaten der Bacillus ϑ niemals fehlte und α, β, ϱ je siebenmal nachgewiesen wurden, konnten die übrigen Bakterien nur 2—3mal, der Bacillus $\varkappa$ nur einmal, aufgefunden werden. Mit diesem Ergebnis verknüpft sich notwendig die Frage, ob wohl die Flora des Darmkanals hinsichtlich der Dauerformen bei demselben Säugling eine konstante oder variable sei. Drei Notizen aus dem Versuchsprotokoll ergeben folgendes: Drei Aussaaten normalen Milchkots eines völlig gesunden, mit „Soxhletmilch“ ernährten Kindes ergaben nur die Gemeinsamkeit von Bacillus ϑ; Versuch 1. am 14. 3. 98 ausserdem noch Bacillus μ, ϱ, ν; Versuch 2. am 12. 4. 98 ϱ, ι; Versuch 3. am 19. 4. 98 δ, $\varkappa$, λ, μ. Aus dieser Thatsache glaube ich mit Sicherheit folgern zu können, dass nur ein Vertreter der Subtilisgruppe und nächster Verwandter des in der Litteratur beschriebenen, der Bacillus ϑ als konstanter Bewohner des Säuglingsdarms zu gelten hat, dass dagegen die Flora hinsichtlich der übrigen Arten schwankt und zwar zweifellos in voller Abhängigkeit von dem Gehalt der genossenen Milch an Formen und Zahl; mit Ausnahme des erwähnten Bacillus ϑ sind sämtliche andere Arten nur passagere Saprophyten; dieser Befund scheint mir ein weiteres Glied in der Kette der Indicienbeweise zu sein, dass die Gruppe der Heubacillen für manche Formen der Sommerdiarrhöen verantwortlich zu machen sind; er erklärt uns leicht, wie die zufällige Aufnahme toxischer Dauerformen die akute Ursache einer schweren Cholera infantum bilden könnte. Eigene Untersuchungen über eventuelle Pathogenität der von mir beschriebenen Arten wären wohl wünschenswert, überschreiten jedoch

ohnehin aus äusseren Gründen scheiternd, den Rahmen dieser Arbeit; ihr Zweck ist erreicht, wenn sie dem Untersucher pathologischer Fälle durch Förderung der Technik und Klärung der normalen bakteriologischen Verhältnisse als Ausgangspunkt und Grundlage dienen kann.

Zum Schlusse meiner Arbeit ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Heim für die stetige Unterstützung durch Rat und That bei ihrer Abfassung meinen ergebensten Dank auszusprechen; ferner bin ich auch Herrn Professor Dr. Hauser für die gütige Übernahme des Referats zum Dank verpflichtet.